

## Artículo original

# Estudio de fluorescencia de la membrana basal y de estructuras intracelulares en tejidos del conducto coclear del cobayo, teñidas con eosina y observadas con microscopio confocal

Juan Ortega Rangel,\* Juan Martín Perea Paz,\* Yolanda Peñaloza López,\* Jesús Espinosa Villanueva\*

## Resumen

### ANTECEDENTES

La membrana basal es una estructura de la matriz extracelular del medio interno que separa las membranas epiteliales del tejido conectivo. Los componentes del conducto coclear, como el limbo espiral, el órgano de Corti y la estría vascular, están integrados por estos tejidos y tienen membrana basal con variantes morfológicas que dependen de la función de sus células.

### OBJETIVO

Comprobar la coexistencia o ausencia de la membrana basal entre las células y tejidos del conducto coclear. Si hay membrana basal, observar sus variantes morfológicas.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se sacrificaron cinco cobayos por perfusión intracardiaca, se disecaron los cráneos y se procesaron con la técnica histológica ordinaria para incluir los cráneos. Se obtuvieron cortes seriados de las cócleas y se tiñeron por la técnica de hematoxilina y eosina; las preparaciones teñidas se observaron en el microscopio confocal.

### RESULTADOS

El tejido conectivo del conducto coclear contiene colágeno, el cual es fluorescente (por la tinción con eosina) al ser excitado con el láser del microscopio confocal.

### CONCLUSIONES

Con la fluorescencia del colágeno se descubre y resalta la membrana basal, uno de los componentes más importantes de la matriz extracelular del medio interno.

#### Palabras clave:

membrana basal, cóclea, confocal.

## Abstract

### BACKGROUND

The basal membrane is a structure of the extracellular matrix of the internal environment, and it separates epithelial membranes of the connective tissue. Components of the cochlear duct, such as the spiral limbo, the Corti's Organ and the vascular groove, are integrated by these tissues and have basal membrane with morphological variants that depend on the function of its cells.

### OBJECTIVE

To verify the existence or absence of the basal membrane between the cells and tissues of the duct to coclear duct. If there is basal membrane, to observe his morphological variants.

### MATERIAL AND METHODS

They were sacrificed five cobay by intracardiac perfussion, the skulls were dissected and processed with the common histological technique to include the skulls. Series cuts of the cocleas were obtained and dyed by hematoxiline and eosin technique; preparations were observed in the confocal microscope.

### RESULTS

The connective tissue of the coclear duct contains collagen, which is fluorescent (by the eosin stain) to be excited with the laser of the confocal microscope.

### CONCLUSSION

With the fluorescence of the collagen the basal membrane is discovered and stood out, one of the most important components of the extracellular matrix.

#### Key words:

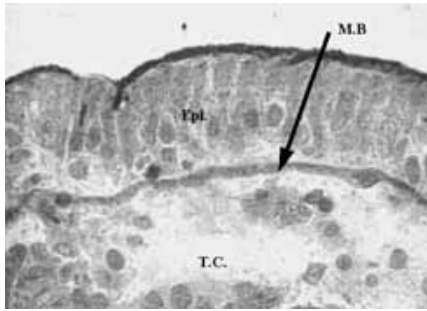
basal membrane, cochlea, confocal.

\*Laboratorio de Microscopía Confocal, Laboratorio de Histomorfología. Instituto de la Comunicación Humana (InCH). Centro Nacional de Rehabilitación (CNR).

**Correspondencia:** Dr. Juan Ambrosio Ortega Rangel. Calzada México Xochimilco 289, Colonia Arenal de Guadalupe, CP 14889, México, DF.

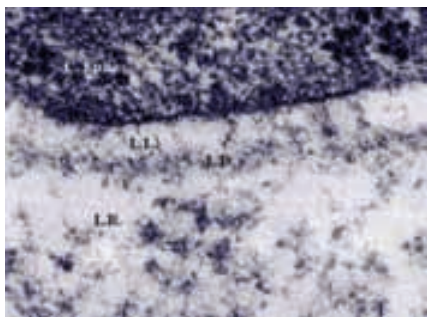
## Antecedentes

La membrana basal es una estructura de la matriz extracelular que separa entre sí algunos tejidos del organismo, como el tejido conectivo y el tejido epitelial; este último integrado por las glándulas y las membranas epiteliales<sup>1</sup> (figura 1).



**Figura 1.** Corte de la membrana mucosa integrada por epitelio (Epi) y tejido conjuntivo subyacente (TC). Ambos tejidos separados por la membrana basal (MB). Tinción PAS-Shiff. Microscopio fotónico 20 X.

Cuando se observa la ultraestructura de la membrana basal con el microscopio electrónico de transmisión, se distinguen dos componentes: la lámina basal, orientada hacia las células epiteliales; y la lámina reticular, enseguida del tejido conectivo subyacente<sup>1</sup> (figura 2). La composición



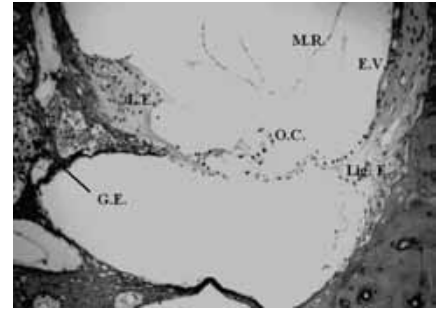
**Figura 2.** Micrografía electrónica. Lámina basal con sus dos capas: lámina lúcida (LL) en contacto con la célula epitelial (C. Epi) y la lámina densa (LD) orientada hacia el tejido conectivo. Lámina reticular (LR) en continuidad con la matriz extracelular del tejido conectivo. 60,000 X. (Y colágeno VII, que son fibras de anclaje entre las dos láminas para soportar la integridad de la membrana basal<sup>2</sup>).

estructural de ambas láminas incluye diversos tipos de macromoléculas con actividad biológica; éstas señalan la ultraestructura y disposición, así como

las funciones que realiza la membrana basal. La lámina basal contiene, entre otras moléculas: colágeno IV (proporciona el sostén de toda la estructura), laminina (ancla la lámina basal con las células epiteliales) y proteoglucanos con heparansulfato (con sus cargas negativas funcionan como filtro iónico para la permeabilidad selectiva de la membrana basal).<sup>2</sup> La lámina reticular (figura 2), no siempre presente, está integrada por colágeno III unido a la membrana basal con el tejido conectivo subyacente.<sup>2</sup> Además de sostener y filtrar partículas, la membrana basal participa en el tránsito selectivo de células (macrófagos y linfocitos) que la atraviesan, pues su función implica la defensa inmunológica en las superficies epiteliales.<sup>3</sup>

El conducto coclear, o laberinto membranoso de la cóclea, está constituido por tejido epitelial, neuroepitelial y conectivo; por lo tanto, entre estos tejidos está la membrana basal con variantes morfológicas que dependen de funciones que realicen las células de los tejidos que limita. En los cortes transversales del conducto coclear (figura 3 panorámica) se observa una estructura en forma de triángulo con vértice truncado (centro de la cóclea) que corresponde al limbo espiral (condensación de tejido conectivo). En la pared inferior sobresale el órgano de Corti. Sus células neuroepiteliales pilosas transforman las vibraciones mecánicas de los sonidos en impulsos nerviosos hacia el centro de la audición del cerebro; éstas se apoyan en las células falángicas, rodeadas por células epiteliales como las de Claudius y Henssen, a la vez lo limitan los epitelios del *sulcus* interno y externo. Este complejo celular lo sostiene la membrana basilar. En la pared externa (base del triángulo) se observa el hueso de la cóclea, el ligamento espiral del tejido conectivo y la estría vascular; esta última es un conjunto celular que limita la luz de la rampa media con la endolinfa y participa en la formación de la misma (figura 3 panorámica). La

pared superior está constituida por la membrana de Reissner, banda delgada integrada por doble capa epitelial que separa la endolinfa de la perilinfa situada en la rampa vestibular.



**Figura 3.** Corte de la cóclea. Conducto coclear en sentido transversal con: el limbo espiral (LE), membrana de Reissner (MR), órgano de Corti (OC) sobre la membrana basilar, la estría vascular (EV) y el subyacente ligamento espiral (Lig. E). En la cavidad del hueso del modiollo: ganglio espiral (GE). Tinción hematoxilina y eosina (H-E). Microfotografía 10X.

El estudio de la membrana basal, en los diferentes segmentos del conducto coclear, se realiza con el microscopio confocal, el cual tiene dos funciones: 1) la emisión del rayo láser excita la fluorescencia de algunas moléculas de la membrana; por lo tanto, esta estructura se define y resalta de otros componentes o estructuras microscópicas; 2) el microscopio confocal, por su alta definición, enfoca diferentes planos ópticos en el espesor del corte histológico; al integrarse en el programa de cómputo del microscopio, proporciona la reconstrucción tridimensional de la membrana basal para obtener mejor precisión para el análisis. También, con la emisión del láser del microscopio confocal se pretende resaltar los componentes fluorescentes intracelulares, como conjuntos de organelos, para relacionarlos con la función celular que desempeñan.

## Objetivos

Comprobar la presencia o ausencia de la membrana basal entre células y tejidos del conducto coclear, con técnicas de tinción simple, aplicadas en el microscopio confocal.

Si coexiste la membrana basal, observar sus variantes morfológicas como espesor, continuidad y disposición, y relacionarlas con la función que realizan los tejidos que limita.

Determinar estructuras intracelulares fluorescentes que participen en las funciones celulares especializadas del conducto coclear.

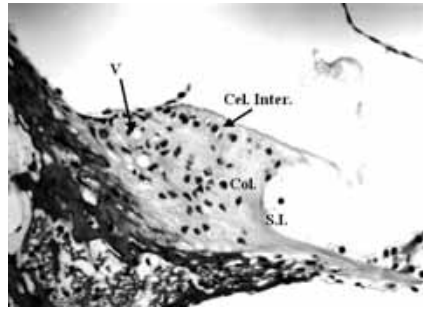
## Materiales y métodos

Se sacrificaron cinco cobayos por perfusión intracardiaca con solución de formol amortiguado al 10%. Se disecaron los cráneos y se colocaron en solución descalcificadora de ácido nítrico al 1% durante dos semanas. Se procesaron con la técnica histológica ordinaria para incluir los cráneos, orientados en posición coronal en bloques de parafina. Se obtuvieron cortes seriados de las cócleas con espesor de 8  $\mu\text{m}$  con el microtomo mecánico rotatorio. Los cortes se tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina, este último es fluorescente al ser excitado por el rayo láser del microscopio confocal en longitud de onda de 488 nanómetros<sup>4</sup>. Las preparaciones teñidas se observaron en el microscopio confocal marca Noran: campo claro y canal de transmisión para las imágenes ordinarias y posteriormente en canal de fluorescencia. Las imágenes fluorescentes se observaron con el filtro Sobel del programa Metamorph del microscopio confocal, el cual resalta perfiles y bordes fluorescentes en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina.

## Resultados

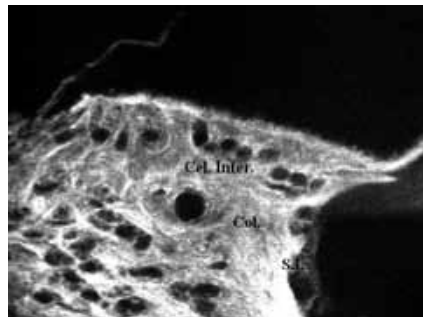
El tejido conectivo del conducto coclear contiene colágeno; cuando se tiñe con eosina, fluoresce al excitarse con el láser del microscopio.<sup>4</sup> Al aplicar el filtro Sobel se definen los bordes fluorescentes que limitan las células y los tejidos; entre éstos resalta la membrana basal por el colágeno que contiene y puede observarse con precisión.

Del centro de la cóclea a la parte externa del conducto coclear, el primer componente corresponde al limbo espiral (en la lámina espiral ósea) que se extiende y continúa lateralmente con la membrana epitelial del *sulcus* interno (figura 4). El limbo es una prominencia del tejido conectivo integrada por células y gran cantidad de colágeno que fluoresce



**Figura 4.** Limbo espiral, prominencia de tejido conectivo integrada por colágeno (Col), células interdentarias (Cel. Inter.), vasos sanguíneos (V) y epitelio del *sulcus* interno (SI). Tinción hematoxilina y eosina (H-E). Microfotografía 20X.

de forma intensa (figura 5). Las células implicadas son las del tejido conectivo (fibroblastos y macrófagos). Sólo en la

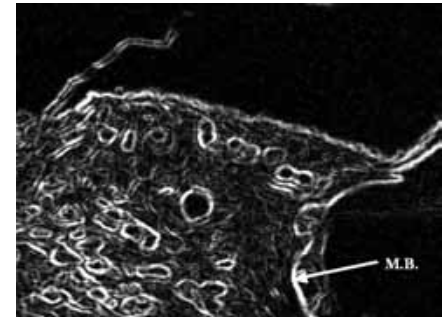


**Figura 5.** Limbo espiral en el canal de fluorescencia del microscopio confocal. Los haces fluorescentes de colágeno (Col) integran el mayor volumen del limbo; en la superficie se limita el borde difuso de las células interdentarias (Cel. Inter.) y la imagen negativa del epitelio del *sulcus* interno (SI). Tinción hematoxilina y eosina (H-E). Microfotografía 40X.

superficie que limita la luz del conducto coclear, se observa una hilera de células especializadas denominadas “interdentarias”. No se les distingue el contorno; sin embargo, resaltan los núcleos con la tinción de hematoxilina y eosina como

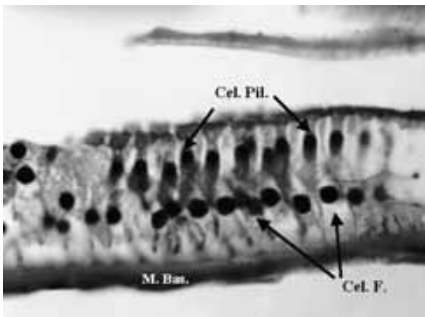
en la fluorescencia ordinaria (figuras 5 y 6). Al aplicar el filtro Sobel no se observa membrana basal definida que limite y separe las células interdentarias del limbo espiral (figura 6). Donde inicia el epitelio del *sulcus* interno se distingue la membrana basal (continua y regular), la cual separa la membrana epitelial (segmento del tejido conectivo) del limbo espiral (figura 6).

El segmento intermedio o piso del conducto coclear corresponde a la mem-

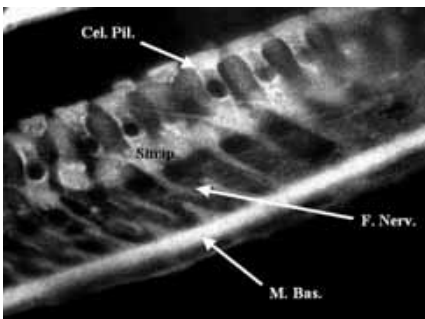


**Figura 6.** Limbo espiral y canal de fluorescencia con el filtro Sobel. Se observan bordes difusos de células y vasos sanguíneos del limbo. Solo la membrana basal (MB) del epitelio del *sulcus* interno tiene una banda gruesa, continua y fluorescente. Tinción hematoxilina y eosina (H-E). Microfotografía 40X.

brana basilar que sostiene las células neuroepiteliales pilosas del órgano de Corti; éstas incluyen en su superficie los estereocilios orientados hacia la luz del conducto coclear en contacto con la endolinfa y la membrana tectoria; el polo profundo de las células pilosas se encuentra en las células falángicas que se apoyan en la membrana basilar (figura 7). Las células pilosas son más fluorescentes en sus extremos, hacia los estereocilios y hacia su base, la cual corresponde a la región sináptica de fluorescencia granular. Todo contrasta con la imagen negativa de las células falángicas (figura 8). La membrana basilar es continua con la banda gruesa fluorescente que se apoya en el órgano de Corti. A su vez lo separa la perilinfa de la rampa timpánica. Esta banda gruesa desprende proyecciones digitiformes que se dirigen a la base de las células



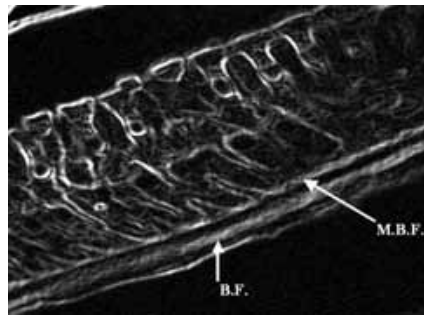
**Figura 7.** Segmento longitudinal del piso del conducto coclear integrado por la membrana basilar (M Bas), células falángicas (Cel F) y células pilosas (Cel Pil) del órgano de Corti. Tinción hematoxilina y eosina (H-E). Microfotografía 60X.



**Figura 8.** Corte oblicuo del órgano de Corti. Membrana basilar (M Bas). Células pilosas (Cel Pil). Zona de sinapsis (Sinap) con imagen granular. Fibras nerviosas (F Nerv). Microscopio confocal, canal de fluorescencia 40X.

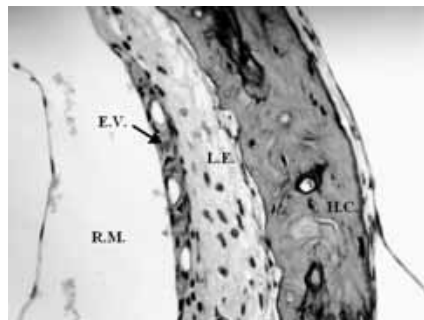
pilosas, cuya fluorescencia es intensa y de aspecto granular (figura 8). En las observaciones con el filtro Sobel, resaltan los bordes y perfiles de las células pilosas y falángicas; la barra fluorescente de la membrana basilar se divide en dos bandas: una está en contacto con las células falángicas (banda delgada y discontinua por las proyecciones digitiformes que la perforan y se orientan hacia las células pilosas); y la otra está en el espesor de la membrana basilar (es más gruesa, continua, poco difusa e integrada por láminas delgadas). Se observa también otra banda fluorescente de línea definida que se mantiene en contacto con las células mesoteliales de la pared superior de la rampa timpánica (figura 9).

La pared lateral o externa del conducto coclear se limita por el hueso del



**Figura 9.** Desdoblamiento de la membrana basilar con el filtro Sobel del canal de fluorescencia. Membrana basal de células falángicas (MBF), banda fibrilar (BF). Tinción hematoxilina y eosina (H-E). Microscopio confocal. 60 X.

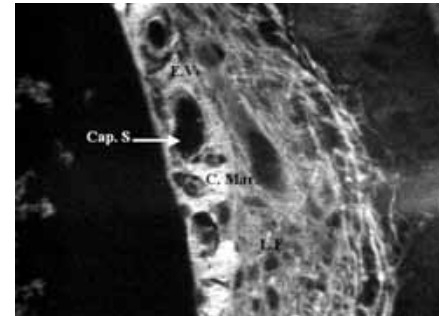
laberinto óseo o cóclea. En este segmento se localizan dos componentes: el ligamento espiral, unido al hueso de la cóclea, y la estría vascular, hacia la luz del conducto coclear (figura 10). El ligamento espiral es un engrosamiento del tejido conectivo con abundantes fibras



**Figura 10.** Corte de la pared externa del conducto coclear. Luz de la rampa media (RM), estría vascular (EV), ligamento espiral (LE) y hueso de la pared de la cóclea (HC). Tinción hematoxilina y eosina (H-E). Microfotografía, campo claro 20X.

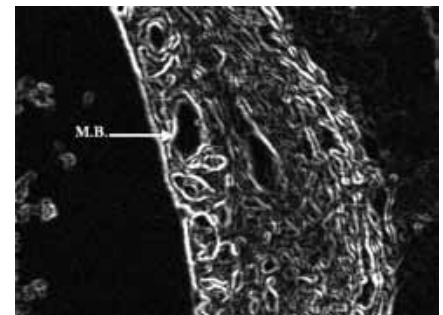
de colágeno, células y vasos sanguíneos que se continúan con el periostio interno de la cóclea (figura 10). La estría vascular es la banda de células eosinófilas que está en contacto con la endolinfa del conducto coclear. Se organiza como membrana epitelial superficial, células estrechamente unidas y vasos capilares entre las mismas (figura 10). Con el canal de fluorescencia se distinguen las fibras de colágeno del ligamento espiral; son irregulares, difusas, engrosadas en el periostio interno de la cóclea y entre

las fibras están las imágenes negativas del núcleo celular y de los vasos (figura 11). En la estría vascular se observan células con citoplasma fluorescente que contrastan con la imagen negativa de



**Figura 11.** Estría vascular (EV) con células marginales fluorescentes (C Mar); imagen negativa de los capilares sanguíneos (Cap S) y fluorescencia difusa del colágeno del ligamento espiral (LE). Tinción hematoxilina y eosina (H-E). Microscopio confocal, canal de fluorescencia 60X.

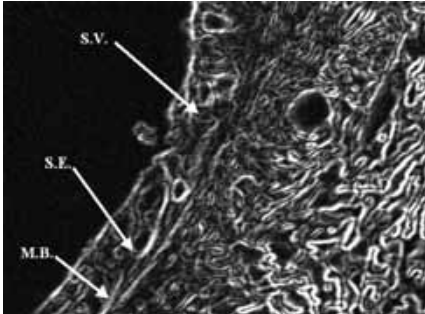
sus núcleos celulares y con la luz de los vasos. La estría distingue el colágeno del ligamento espiral porque el primero es más fluorescente (figura 11). Al observar con el filtro Sobel, se marcan los bordes fluorescentes que limitan el núcleo celular, los vasos sanguíneos y el límite, con la luz de la rampa media (figura 12); sin embargo, no se marca el límite entre las células basales de la estría vascular y el



**Figura 12.** Estría vascular y ligamento espiral con filtro Sobel del canal de fluorescencia. Bordes y perfiles de los componentes celulares, núcleos, tisulares y colágeno; membrana basal (MB) continua, sólo en los capilares de la estría vascular. Tinción hematoxilina y eosina (H-E). Microscopio confocal 60X.

tejido conectivo del ligamento espiral (figura 12). Esto contrasta al comparar la estría vascular con la membrana

epitelial del *sulcus* externo (revestido por un epitelio cúbico simple) que se apoya en una banda con fluorescencia intensa, continua y homogénea que lo limita del tejido conectivo subyacente. (figura 13).



**Figura 13.** Transición entre la estría vascular (SV) y el epitelio del *sulcus* externo (SE). La membrana basal (MB) continúa en la membrana epitelial del *sulcus* externo. Filtro Sobel del canal de fluorescencia. Tinción hematoxilina y eosina (H-E). Microscopio confocal, 60X.

## Discusión

Con la fluorescencia del colágeno se descubre y resalta la membrana basal, uno de los componentes más importantes de la matriz extracelular del medio interno. Para distinguir el colágeno de otros organelos teñidos con eosina, se aplica el filtro Sobel del programa Methamorf del microscopio confocal. Éste resalta los perfiles y bordes fluorescentes; como la membrana basal se localiza entre las células epiteliales y la matriz extracelular, se define la estructura con precisión.

En el ángulo interno del conducto coclear predomina el limbo espiral integrado por tejido conectivo con abundante colágeno; esta estructura se continúa del conducto hacia la pared externa con el *sulcus* interno constituido por la membrana epitelial. En la superficie libre del limbo se encuentra la hilera de células interdentarias, de las cuales se desprende la membrana tectoria.<sup>5</sup> Aunque la disposición de estas células en una superficie es semejante al epitelio, la falta de una membrana basal que las separe de la matriz extracelular indica que son del tejido conectivo. Para comprobarlo, se

comparan las células interdentarias con las epiteliales del *sulcus* interno que se apoyan en la membrana basal completa. A esta observación se suma el aspecto funcional, en el que las células interdentarias producen la membrana tectoria, constituida por componentes de la matriz del tejido conectivo (colágeno tipo II y proteoglucanos<sup>5,6</sup>). Con la ausencia de la membrana basal se confirma que el limbo espiral y las células interdentarias son de origen mesenquimatoso y conforman el tejido conectivo especializado del conducto coclear.

La pared inferior del conducto coclear corresponde a la membrana basilar que sostiene el órgano de Corti. Se analizan los cortes oblicuos del órgano de Corti, cuyas células neuroepiteliales pilosas, sobrepuestas en las falángicas, se disponen en hileras longitudinales. La imagen granular fluorescente que se observa en la región apical y en la base de las células pilosas, corresponde a acumulaciones de mitocondrias eosinófilas (organelos especializados en la producción de energía química en las moléculas de ATP para la transducción de los estímulos mecánicos en eléctricos). Estos organelos están situados en los estereocilios de las células pilosas y en la base de las células implicadas en la sinapsis, donde el elevado metabolismo necesita energía para la síntesis, liberación y reciclaje de neurotransmisores (indispensables en la conducción de los estímulos nerviosos). Las proyecciones digitiformes que se desprenden de la zona basal fluorescente corresponden a fibras nerviosas. La membrana basilar se observa como banda fluorescente gruesa. Cuando se aplica el filtro Sobel, se observa una membrana basal delgada que sostiene a las células falángicas y una banda fibrilar gruesa, integrada por macromoléculas como: glucosaminoglucano heparansulfato,<sup>7,8</sup> colágeno II y IV,<sup>8,9</sup> laminina<sup>10</sup> y fibronectina.<sup>11,12</sup> Estas moléculas fibrilares explican la función de la membrana basilar, la cual consiste

en mantener la tensión adecuada para que las ondas transmitidas por la perilinfa de la rampa timpánica hagan vibrar la membrana basilar y los movimientos de alta frecuencia se transmitan a los estereocilios de las células pilosas; los estereocilios, en contacto con la membrana tectoria, se flexionan y descargan el potencial de acción que se trasmite por la sinapsis a las vías nerviosas aferentes, conduciéndolos al centro de audición del cerebro y percibir los sonidos.

La pared externa del conducto coclear está compuesta, de afuera hacia adentro, por: el hueso de la cóclea, el ligamento espiral y la estría vascular en contacto con la endolinfa del conducto. La matriz del hueso está constituida por fibras de colágeno I; sin embargo, no son fluorescentes por estar impregnadas con sales de calcio. El ligamento espiral, por ser estructura de unión entre la estría vascular y la pared ósea, debería estar integrado por haces compactos de colágeno, pero en estas observaciones la fluorescencia es tenue, ya que las fibras de colágeno son delgadas y separadas por los fibroblastos y la matriz extracelular. Estas imágenes indican que el ligamento no es solamente estructura de sostén sino que, al permanecer como tejido laxo, favorece la difusión del ion potasio (reciclable desde el órgano de Corti) por el mismo ligamento y se bombea por la estría vascular hacia la endolinfa de la luz del conducto coclear.

La estría vascular, además de limitar la rampa media coclear, proporciona grandes concentraciones de potasio a la endolinfa. Este elemento es utilizado por las células neurosensoriales pilosas en la transducción mecánica y eléctrica para generar los potenciales de acción que se transmiten como impulsos nerviosos aferentes a los centros de la audición del cerebro. El flujo constante de potasio hacia la endolinfa requiere la filtración de líquido capilar de la estría vascular, del ligamento espiral<sup>13</sup> y de la matriz del ligamento espiral.<sup>14</sup> Las células marginales

de la estría vascular secretan el potasio hacia la endolinfa. En este estudio se demuestra que las células marginales son intensamente fluorescentes debido al número elevado de mitocondrias que contienen. La coexistencia de estos organelos explica la necesidad de generar energía en las moléculas de ATP, indispensable para el funcionamiento de la bomba Na K-ATPasa, la cual impulsa el potasio hacia la rampa media y aumenta su concentración en la endolinfa. La estría vascular corresponde a un epitelio. Al observar las estructuras fluorescentes con el filtro Sobel, se comprueba que la estría carece de membrana basal que separe el tejido conectivo del ligamento espiral. Se agregan, también, capilares entre sus células rodeados de una membrana basal que funciona como filtro iónico por las cargas negativas que contiene.<sup>15</sup> Al comparar la estría con el epitelio que reviste el *sulcus* externo de la membrana basal íntegra y gruesa, indica que la estría vascular también corresponde a tejido conectivo mesenquimatoso modificado. La estría vascular altera su morfología y función por atrofia o por engrosamiento de la membrana basal de sus capilares.<sup>15</sup> Esto sucede durante el envejecimiento<sup>16</sup> y en disfunciones metabólicas como la diabetes mellitus, quizás por alteraciones como la hipoacusia<sup>17</sup> o presbiacusia.<sup>18</sup> Los resultados obtenidos en este estudio justifican la importancia de continuar con el análisis y el estudio morfológico de los componentes del laberinto membranoso; y a su vez, sirven de base como imágenes comparativas para ensayos anatomopatológicos<sup>19</sup> y experimentales.

## Conclusiones

La membrana basal tiene características ordinarias en zonas donde sostiene y aísla células que integran epitelios sensoriales como el de Corti.

La estría vascular se relaciona con la permeabilidad y el tránsito de líquidos

entre los capilares y el lumen del conducto coclear.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo técnico y profesional que tan desinteresadamente realizó el **Ing. Biomédico Efrén Alatorre Miguel**, para la realización del manuscrito.

Investigación/Laboratorio de Neurofisiología/CNR/MR.

## Referencias

- Miosge N. The ultrastructural composition of basement membranes *in vivo*. *Histol Histopathol* 2001;16(4):1239-48.
- Timpl R. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:618-24.
- Ortega-Rangel JA, Perea-Paz JM, Molina-Tellez E, Espinosa Villanueva J. Revisión y Descripción Microscópica de la Membrana Basal de la Mucosa de Laringe Humana, Observada con el Microscopio Confocal. *An Orl Mex* 2003;48(3):21-28.
- Rubio CA, Slezak P. The subepithelial band in collagenus colitis is autofluorescent: a study in H-E stained sections source. *In Vivo* 2002;16(2):123-6.
- Santi P, Lease K, Harrison RG, Wicker EM. Ultrastructure of proteoglycans in the tectorial membrane. *J Electron Microscop Tech* 1990;15:293-300.
- Tsuprun V, Santi P. Crystalline arrays of proteoglycan and collagen in the Tectoria Membrane. *Matrix Biol* 1996;15:31-38.
- Tsuprun V, Santi P. Proteoglycan arrays in the cochlear basement membrane. *Hear Res* 2001;157:65-76.
- Tsuprun V, Santi P. Ultrastructure and immunohistochemical identification of the extracellular matrix of the chinchilla cochlea. *Hear Res* 1999;129:35-49.
- Cosgrove D, Kornak M, Samuelson G. Expression of basement membrane type IV collagen chains during postnatal development in the murine cochlea. *Hear Res* 1996;100:21-23.
- Cosgrove D, Samuelson G, Pinnt J. Immunohistochemical localization of basement membrane collagens and associated proteins in the murine cochlea. *Hear Res* 1996;97:54-65.
- Santi PA, Larson JT, Furcht LT, Economou TS. Immunohistochemical localization of fibronectin in the chinchilla cochlea. *Hear Res* 1989;39:91-102.
- Wolf NK, Koehn FJ, Ryan AF. Immunohistochemical localization of fibronectin-like protein in the inner ear of the developing gerbil and rat. *Brain Res Develop* 1992;65:21-33.
- Torihara K, Tatsuo S, Soyuki I, Tamotsu M. Anionic sites in blood capillaries of the mouse cochlear duct. *Hear Res* 1994;77:69-74.
- Spicer SS, Schulte AB. The fine structure of spiral ligament cells relates to ion return of the stria and varies with place-frequency. *Hear Res* 1996;100:80-100.
- Sakaguchi N, Spicer SS, Thomopoulos GN, Schulte BA. Increased laminina deposition in capillaries of the stria vascularis of quiet-aged gerbils. *Hear Res* 1997;105:44-56.
- Thomopoulos GN, Spicer SS, Gratton MA, Shulte BA. Age-related thickening of basement membrane in stria vascularis capillaries. *Hear Res* 1997;111:31-41.
- Pauler M, Shuknecht HF, Whith JA. Atrophy of the stria vascularis as a cause of sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1988;98:754-9.
- Schuknecht HF, Gacek MR. Cochlear pathology in presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993;102:1-16.
- Smith RJ, Steel KP, Barkway C, Soucek S, Michaels L. A histological study of nonmorphogenetic forms of hereditary hearing impairment. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;118:1085-94.